

БИОХИМИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ АРМЕНИИ

Егназарян Э.М., Барсегян Э.Х.

*Ереванский государственный университет, Алека Манукяна 1, 0025 Ереван, Армения.
e-mail: eduard@ysu.am, Armsaf96@rambler.ru*

BIOCHEMICAL ADAPTATION OF ARMENIAN AMPHIBIANS

Yeghiazaryan E.M., Barsegyan E. Kh.

Yerevan State University, Alex Manoogian 1, 0025 Yerevan, Armenia

Все организмы, в зависимости от вида экскретируемого конечного продукта распада азотсодержащих соединений, делятся на аммонотелические, выделяющие аммиак, уреотелические – мочевины и урикоотелические – мочевую кислоту. В процессе эволюции

позвоночных животных, при переходе от водных условий обитания к наземным, сформировался механизм биохимической адаптации, лежащий в основе морфофизиологической адаптации, ярким примером которого является механизм формирования у амфибий уреотелического типа экскреции азота, обусловленный сложным процессом метаболизма, поскольку в жизненном цикле большинства амфибий происходит смена аммонотелизма (головастики) на уреотелизм (взрослые лягушки). Интересно, что у головастиков представлены все ферменты орнитинового цикла, которые, однако, в их организме не функционируют в виде единого цикла. И лишь после метаморфоза ферменты биосинтеза аргинина и аргиназы печени функционируют как единый механизм орнитинового цикла мочевинообразования. Таким образом, до метаморфоза синтезированный аргинин недоступен для имеющейся аргиназы, он атакуется аргиназой лишь после метаморфоза. На основании этих фактов, многие авторы заключают, что суть формирования уреотелизма при переходе амфибий от обитания в водной среде к наземному образу жизни заключается в изменении компарментализации аргиназы или модификации фермента, в результате чего эндогенно синтезированный аргинин становится доступным для аргиназы. Однако эта точка зрения была пересмотрена после того, как было выдвинуто и обосновано положение о существовании в природе двух различных форм аргиназы: уреотелической, присутствующей в печени уреотелических животных и участвующей в механизме нейтрализации аммиака орнитиновым циклом биосинтеза мочевины, и неуреотелической, не связанной с механизмом нейтрализации аммиака, представленной во всех организмах и тканях, вне зависимости от типа азотистого катаболизма и имеющей иные функции в метаболизме клеток - обеспечении включения аргинина в биосинтез пролина и полиаминов, лимитировании процессов биосинтеза однозамещенных гуанидиновых соединений, каковым является креатин, контролировании биосинтеза гистонов и др. (Арцруни и др., 2002; Барсегян и др., 2002; Барсегян, Никогосян, 1979). Очевидно, неуреотелическая аргиназа контролирует и биосинтез NO из аргинина (Давтян, 1968; Давтян, Буниатян, 1970).

Было показано, что при индивидуальном развитии, в особенности при метаморфозе амфибий, происходят глубокие изменения в изоэнзимном спектре аргиназ, и на определенном этапе развития индуцируется уреотелическая аргиназа, которая, интегрируясь с ферментами биосинтеза аргинина, обуславливает формирование орнитинового цикла мочевинообразования.

Целью исследования было изучение особенностей изоэнзимного спектра аргиназы печени ряда представителей амфибий, распространенных на территории Армении, а также изыскание возможности использования полученных данных в качестве дополнительных характеристик для классификации отдельных подвидов земноводных.

Объектом исследований были 5 видов лягушек, распространенных в Армении:

I – *Rana ridibunda* Pallas, 1771, обитающие в 1) районе озера Айгер-лич и реки Мецамор, 856 м н.у.м. (полупустынная зона); 2) Арташатском районе, 851 м н.у.м. (пустынная зона); 3) окрестностях села Анкаван, 1937 м н.у.м. (высокогорная зона); 4) окрестностях села Опакан, 1000 м н.у.м. (горнолесная зона); 5) районе озера Севан, 2000 м н.у.м. (горнопустынная зона); 6) районе горы Арагац, 2500 м н.у.м. (высокогорная зона).

II – *R. macrocnemis* Boulenger, 1885, обитающие в Анкаване.

III – *Hyla arborea schelkownikowi* Chernov, 1926, обитающие в Дилижанском районе, Парзлич, 740 м н.у.м. (горнолесная зона).

IV – *H. savignyi* Audouin, 1827, обитающие в Наирыйском районе, село Прошян, 1100 м н.у.м. (полупустынная зона).

V – *Pelobates syriacus* Boettger, 1889, обитающие в Ехегнадзорском районе, село Ринд, 1400 м н.у.м. (полупустынная зона).

Ферментативную активность определяли по ранее описанному методу. Фракционирование экстрактов печени проводили методом гель-фильтрации на колонках с сефадексом О-200 (Pharmacia, Upsala, Sweden) и ионообменной хроматографией на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой (колонка 1.5x 36 см, уравновешенная 0.005 М трис-НС1 буфером).

Ступенчатая элюция проводилась растворами KCl в том же буфере при повышении молярности от 0 до 0.3 M. Скорость элюции 30 мл/час, объем фракции – 5 мл.

Самая высокая активность фермента нами отмечена у *H. arborea schelkownikowi* и *H. savignyi* (соответственно 43000 и 44250 мкмоль/г). Несколько ниже была активность фермента у *R. macrocnemis* (обе группы) – 32000-39000 мкмоль/г. Активность аргиназы печени у *R. ridibunda* (все 6 групп) и у *P. syriacus* была почти вдвое ниже, чем у вышеуказанных видов (20800 и 24400 мкмоль/г).

Таким образом, не обнаруживается корреляции между общей активностью аргиназы печени и выживаемостью того или иного вида исследованных лягушек. В этом отношении является наглядным факт очень низкой активности фермента как у экологически пластичного вида *Rana ridibunda*, так и у *Pelobates syriacus*, имеющей узкую приспособляемость.

Можно было бы предположить, что печень организмов, адаптированных к различным условиям среды должна содержать качественно различные наборы изоферментов. В связи с этим, мы задались целью выяснить, играют ли условия обитания животных роль в индукции отдельных изоферментов, и какое отражение находят эти процессы в механизме становления уреотелизма.

С этой целью экстракт печени лягушек пропускали через колонки с сефадексом С-200, далее выявленную активную фракцию фермента (изофермент I) пропускали через колонки с ДЭАЭ-целлюлозой. Результаты исследования четко показали, что в печени *R. ridibunda*, *R. macrocnemis* и *H. a. schelkownikowi* проявляется одна высокомолекулярная аргиназа, а у двух видов, кроме того, проявляется и вторая (низкомолекулярная) аргиназа. Указанные различия в изоэнзимном спектре аргиназы являются весьма существенными биохимическими характеристиками. Примечательно, что *H. a. schelkownikowi* и *H. savignyi* различаются по указанным характеристикам, что является существенным аргументом в пользу их различной видовой принадлежности.

В последующих экспериментах дополнительному фракционированию на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой подвергались только первые пики аргиназных активностей экстрактов печени всех изученных групп лягушек, выделенных методом гель-фильтрации.

Для *R. ridibunda* (все 6 групп), *R. macrocnemis* (обе группы) и *H. a. schelkownikowi* показана резкая выраженность изофермента 1B, причем порядок убывания активности у трех изоферментов следующий: *R. ridibunda* (I и VI группы) $1B > 1C > 1A$; *R. ridibunda* (II, III, IV, V группы) $1B > 1A > 1C$; *R. macrocnemis* (I и II группы) $1B > 1C > 1A$; *H. a. schelkownikowi* $1B > 1A > 1C$.

Обращает на себя внимание факт резкой индукции изофермента 1A и 1C у *H. savignyi* и *P. syriacus*, где порядок убывания активности изоферментов был следующий: $1C > 1B > 1A$ и $1A > 1B > 1C$.

Таким образом, изоферментный состав аргиназы печени различен не только для различных видов лягушек, но и для представителей одного и того же вида, в зависимости от условий местообитания.

Обнаруженные нами различия в изоферментном спектре аргиназы печени отдельных представителей бесхвостых амфибий отражают существенные различия в регуляции биохимических процессов. Очевидно, эти различия играют определенную роль в адаптации организмов к определенной среде обитания. Без сомнения, одним из возможных способов адаптации к определенным условиям жизни на молекулярном уровне является изменение степени экспрессии изоферментов.

В природе распространены смешанные популяции, составленные различными подвидами лягушек в разных количественных соотношениях, что вызывает затруднения для систематиков. Известно, что только при определенном соотношении этих подвидов достигается оптимальная жизнедеятельность и плодовитость популяции, поскольку для лягушек характерен "групповой эффект" – снижение животными уровня метаболизма в группе, по сравнению с находящейся в таких же условиях одиночной особью. Это явление

способствует экономному расходованию резервных веществ, что увеличивает возможность выживания.

У трех групп *R. ridibunda*, отловленных в различных районах республики, резко выражен изофермент 1В, который играет решающую роль в механизме становления уреотелизма. Степень активирования двух других изоферментов различна, в зависимости от местообитания. Так, у *R. ridibunda* I и VI групп $1C > 1A$, а у II и III, IV и V групп – $1A > 1C$. Вероятно, I и VI группы *R. ridibunda* определенным образом отличаются от четырех других групп того же вида, хотя при определении их по-Терентьеву, классификация которого основана на внешних морфологических характеристиках животных, никаких отличий не обнаруживается. Биологические особенности данной популяции *R. ridibunda* играют определенную роль в обеспечении приспособления животных к конкретным условиям среды.

Результаты исследований изоферментных спектров позволили также четко различить *H. a. schelkownikowi* и *H. savignyi*, которые по морфологическим характеристикам трудно различимы. Это созвучно ранее проведенным нами исследованиям (Егиазарян, 2007).

Таким образом, изоферментный спектр аргиназы печени меняется на отдельных этапах онтогенетического развития амфибий, а также в зависимости от условий среды, как в количественном, так и в качественном отношении, что, в свою очередь, обеспечивает включение или выключение определенных метаболических путей, различные этапы которых катализируются теми или иными изоферментами аргиназы. Эти изменения отражают существенные различия в регуляции биохимических процессов, что, очевидно, проявляется в возможностях выживания и развития в определенной среде и может рассматриваться как проявление "биохимической адаптации" к определенным условиям среды.

Литература

- Арцруни Н.А., Барсегян Э.Х., Давтян М.А. 2002. Изучение аргиназы печени лягушки *R. ridibunda* после инактивации при действии ЭДТА и последующей реактивации // Биол. ж. Армении, 54 (1-2): 3-8.
- Барсегян Э. Х., Арцруни Н.А., Давтян М.А. 2002. Сравнительное изучение аргиназы печени лягушки *R. ridibunda* до и после метаморфоза // Биол. ж. Армении, 54 (1-2): 9-13.
- Барсегян Э.Х., Никогосян Р.Ц. 1979. Изоферменты аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* // Биолог.ж. Армении, 32 (12): 1176-1178.
- Давтян М.А. 1968. О роли орнитинового цикла и его компонентов // Вопр. биохим. мозга, 4: 237.
- Давтян М.А., Буниатян Г.Х. 1970. Две молекулярные формы аргиназы головного мозга крыс // Вопр. биохим. мозга, 6: 15-22.
- Егиазарян Э.М. 2007. Видовая дифференциация амфибий, распространенных на территории Армении // Изв. аграрной науки, 5 (4): 29-37.

Abstract

The differences of liver arginase isoenzyme spectrum of 5 Amphibian species from different geographical zones of Armenia were investigated. It was shown that there are essential differences in regulation of biochemical processes which means possibilities for Amphibians to survive and develop in any environment, and can be considered as a biochemical adaptation to certain environment.